



②① Aktenzeichen: 197 01 141.1-41
②② Anmeldetag: 16. 1. 97
④③ Offenlegungstag: -
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 9. 4. 98

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

⑦④ Vertreter:
Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Frohwitter,
Geissler & Partner Patent- und Rechtsanwälte,
81679 München

⑦② Erfinder:
Heidtmann, Hans Heinrich, 35043 Marburg, DE;
Müller, Rolf, 35037 Marburg, DE; Sedlacek,
Hans-Harald, 35041 Marburg, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
Int. J. Cancer 50, S.460ff, 1994;

⑤④ Genkonstrukte für durch Proteasen aktivierbare Wirksubstanzen

⑤⑦ Die Erfindung bezieht sich auf ein Genkonstrukt, da-
durch charakterisiert, daß es ein Protein exprimiert, wel-
ches durch Enzyme, freigesetzt von Zellen, aktiviert wird,
bei welchem das Genkonstrukt besteht aus den Kompo-
nenten
a) mindestens einem Promotorelement;
b) mindestens einer DNA-Sequenz für einen Wirkstoff
(Protein B);
c) mindestens einer DNA-Sequenz für eine durch ein En-
zym, freigesetzt von einer Säugierzelle, spezifisch spaltba-
re Aminosäuresequenz (Teilstruktur C);
d) mindestens einer DNA-Sequenz für ein Peptid oder
Protein (Teilstruktur D), welches durch Bindung über die
spaltbare Aminosäuresequenz (Teilstruktur C) an den
Wirkstoff (Protein B) die Wirksamkeit des Wirkstoffes
(Protein B) hemmt;
und zur Verwendung des Nukleinsäurekonstrukts zur Her-
stellung eines Heilmittels zur Behandlung von Krankhei-
ten.

Beschreibung

1) Einleitung

Ähnlich wie entzündete Bereiche unterscheiden sich Tumoren von dem umgebenden Normalgewebe durch eine erhebliche Zunahme der Bildung und Sekretion von Proteasen [Übersicht bei Schmitt et al, Fibrinol. 6, 3 (1992), Cottam et al, Int. J. Oncol. 2, 861 (1993), Tryggvason et al, Breast Cancer Res. And Treatm. 24, 209 (1993), Leto et al, Anticancer Res. 12, 235 (1992), Hart, Fibrinol. 6, 11 (1992), Albini et al, J. Natl. Cancer Inst. 83, 735 (1991)]. Zu diesen gehören beispielsweise Plasminogenaktivatoren, Cathepsine und Matrix-Metalloproteinasen.

Eine wesentliche Funktion dieser Tumorproteasen ist die Auflösung der extrazellulären Matrix für die Einwanderung und das infiltrative Wachstum der Tumorzellen in Normalgewebe.

Zugleich stellen diese Proteasen einen Schutz des Tumors vor den körpereigenen Abwehrmechanismen dar, in dem die für die Abwehr notwendigen Wirkstoffe durch die vom Tumor gebildeten Proteasen gespalten und damit inaktiviert werden. So werden beispielsweise Antikörper, Zytokine und Wachstumsfaktoren, Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren und Mediatoren durch Tumorproteasen inaktiviert.

In Kenntnis dieser Schutzmechanismen ist es das Ziel vieler Untersuchungsgruppen gewesen, durch Hemmung der Tumorzellproteasen das infiltrative und Metastasenwachstum von Tumoren und die Inaktivierung von körpereigenen Abwehrmechanismen zu inhibieren [Übersichten bei Hocman, Int. J. Biochem. 24, 1365 (1992), Troll et al, JNCI 73, 1245 (1984), Ray et al, Eur. Respir. 7, 2062 (1994), Koop et al, Cancer Res. 54, 4791 (1994), Chiriri et al, Int. J. Cancer 58, 460 (1994), Denhardt et al, 59, 329 (1993), Melchiori et al, Cancer Res. 52, 2353 (1992)].

Jedoch ist dieser Versuchsansatz bislang nur wenig erfolgreich gewesen, meist aus stöchiometrischen wie auch pharmakokinetischen Gründen.

Demzufolge wurde versucht, statt einer Hemmung von Tumorzellproteasen diese zu nutzen für eine Aktivierung von bakteriellen Toxinen wie beispielsweise des α -Hämolysins von *Staphylococcus aureus* [Panchal et al, Nature Biotechn. 14, 852 (1996)]. Hierzu wurden durch Einfügung einer Aminosäuresequenz XX-Arg-X in die Position 129 bis 132 des α -Hämolysins inaktive Mutanten erzeugt, welche erst durch Tumorproteasen, wie z. B. Cathepsin B an dieser eingefügten Aminosäuresequenz gespalten und dadurch für eine zytolytische Wirksamkeit aktiviert wurden.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden Proimmunolysine vorgeschlagen [Panchal et al, Nature Biotechn. 14, 852 (1996)], welche aus einem Antikörper gekoppelt an einem durch Tumorproteasen aktivierbaren α -Hämolysin von *Staphylococcus aureus* oder einem Equinatoxin II von der Seeanemone bestehen, wobei der Antikörper die Zielzellspezifität des Kopplungsproduktes bestimmt.

Experimentelle Ergebnisse zum Beleg der antitumoralen Aktivität des Antikörpertoxinproduktes wurden nicht vorgestellt, jedoch auch ohne diese Daten ist das vorgeschlagene Konzept aus folgenden Gründen als unzulänglich für eine Tumorthherapie anzusehen:

— Es wurden xenogene körperfremde Lysine bzw. Toxine ausgewählt, welche für den Wirtsorganismus (Patienten) immunogen sind und dadurch im Wirtsorganismus eine Immunreaktion auslösen, welche das Antikörpertoxinkonjugat neutralisieren und inaktivieren.

— Von tumorspezifischen Antikörpern wie auch Immuntoxinen ist bekannt [Sedlacek et al, Antibodies as Carriers of Cytotoxicity, Contrib. to Oncol 43, Karger Verlag, München, 1992], daß sie aufgrund ihrer Molekülgröße wie auch der rheologischen Bedingungen am Tumor nur in einer sehr geringen Menge (0,01—0,001% des gegebenen Antikörpers bzw. Immuntoxins/g Tumor) am Tumor lokalisieren und diesen nur unvollständig penetrieren, so daß nicht alle Tumorzellen oder nur ein geringer Teil der Tumorzellen eines Tumors abgetötet werden können.

— Die Expression von Tumorantigenen, gegen welche der Antikörper gerichtet ist, ist meist unterschiedlich zwischen den einzelnen Tumorzellen und variable Antigen-negative Tumorzellen entziehen sich dem Angriff der Antikörper bzw. Immuntoxine. Von den Tumorzellen abgesonderte Antigene neutralisieren die Antikörper in der Peripherie des Tumors (Übersicht: Sedlacek et al, Monoclonal Antibodies in Tumor Therapy, Contrib. to Oncol, Karger Verlag, 1988).

Angesichts dieser Unzulänglichkeiten besteht weiterhin ein großer Bedarf nach einer zielzellspezifischen Therapie für Tumoren und Entzündungen. Mit der vorliegenden Erfindung wird eine neue Technologie vorgestellt, welche die Ausschüttung von Enzymen in Tumoren oder Entzündungsgebieten nutzt für die lokale Freisetzung von Wirkstoffen, deren inaktive Vorstufen (durch Gene eingeführt) in Tumorzellen, tumorassoziierten Zellen oder Entzündungszellen exprimiert werden.

2) Allgemeine Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung stellt in der einfachsten Zusammensetzung ein Nukleinsäurekonstrukt dar, welches aus folgenden Komponenten besteht:

- a) mindestens ein Promotorelement
- b) mindestens eine DNA-Sequenz für einen Wirkstoff (Protein B)
- c) mindestens eine DNA-Sequenz für eine durch ein Enzym, freigesetzt von einer Säugerzelle, spezifisch spaltbare Aminosäuresequenz (Teilstruktur C)

d) mindestens eine DNA-Sequenz für ein Peptid (Teilstruktur D), welches durch Bindung über die Aminosäuresequenz (Teilstruktur C) an den Wirkstoff (Protein B) die Wirksamkeit des Wirkstoffes (Protein B) hemmt.

Die Komponenten können in ihrer einfachsten Form beispielsweise wie in Fig. 1 angeordnet sein.

Durch eine Aktivierung der Promotorsequenz [Komponente a)] wird die Expression eines Proteins BCD, kodiert von den Komponenten b), c) und d) in die Wege geleitet. Dieses Protein BCD wird in der Aminosäuresequenz C durch zelluläre Enzyme, z. B. Proteasen gespalten. Durch diese Spaltung wird das Protein B freigesetzt, welches den aktiven Wirkstoff darstellt. "Proteasen" (oder "Enzyme") im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, daß ein oder mehrere Proteasen (oder Enzyme) gemeint sein können.

Entsprechend der Erfindung kann die Nukleotidsequenz für die Komponente b) erweitert werden um eine Komponente b'). Diese Komponente b') kodiert für einen Liganden (Teilstruktur B'), welcher den Wirkstoff an eine Zielstruktur bindet.

Die Komponente b') kann beispielsweise wie in Fig. 2 angeordnet sein.

Die Expression des Nukleinsäurekonstruktes entsprechend Fig. 2) führt zu einem Protein B'BCD, welches über den Liganden (Teilstruktur B') an eine Zielstruktur bindet und in der Teilstruktur C durch zelluläre Proteasen gespalten wird, so daß der aktive Wirkstoff Protein B'BD freigesetzt wird.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte oder "Genkonstrukte" bestehen bevorzugterweise aus DNS. Unter dem Begriff "Nukleinsäurekonstrukte" werden künstliche Gebilde aus Nukleinsäure verstanden, die in den Zielzellen transkribiert werden können. Sie sind bevorzugt in einen Vektor eingefügt, wobei Plasmidvektoren oder virale Vektoren besonders bevorzugt sind.

Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte wird ein Strukturgen [Komponenten b) + c) + d) oder b') + b) + c) + d)] je nach Wahl des Promotorelements [Komponente a)] entweder unspezifisch, zellspezifisch, virusspezifisch, unter bestimmten metabolischen Bedingungen oder zellzyklusspezifisch exprimiert oder aber es werden mindestens zwei unterschiedliche Promotorelemente zusammen kombiniert für eine je nach Wahl dieser Promotorelemente eingeschränkte Expression des Strukturgens.

Dieses Strukturgen kodiert für ein Protein, welches in seiner Teilstruktur C durch ein Enzym gespalten wird. Enzyme werden in einem Organismus bevorzugt freigesetzt von Tumoren und Tumorzellen, wie auch von Zellen, welche an einem Entzündungsgeschehen beteiligt sind [Übersicht bei Barrett et al, *Mammalian Proteases*, Academic Press, London 1980; Sedlacek und Möry, *Immune Reactions*, Springer Verlag, 1995)]. Zu diesen Enzymen gehören beispielsweise Proteasen, Glycosidasen, Lipasen.

Ein besonderer Gegenstand dieser Erfindung ist die Auswahl der Komponente c) derart, daß das exprimierte Protein B'BCD bzw. BCD bevorzugt in seiner Teilstruktur C von Proteasen, gebildet in Tumoren oder sezerniert von Tumorzellen oder Entzündungszellen, gespalten wird. Beispielsweise gehören hierzu Plasminogenaktivatoren, wie Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp oder der Tissue Plasminogenaktivator; Cathepsine, wie das Cathepsin B, das Cathepsin D, das Cathepsin L, das Cathepsin E oder das Cathepsin H bzw. deren Vorstufen (ProCathepsine); Matrix-Metalloproteinasen (MMP), wie Collagenasen beispielsweise Collagenase der Gruppen I, II, III, IV oder V; Stromelysine beispielsweise Stromelysin 1, -2 oder -3; Metrilysine; Gelatinasen, wie Gelatinase A (MMP-2), Progelatinase B (MMP-9) und A [Übersichten bei Pappot et al, *Lung Cancer* 12, 1 (1995), Schmitt et al, *Fibronolysis* 614, 3 (1992), Monsky et al, *Cancer Biol.* 4, 251 (1993), Rochefort et al, *Medecine/Sciences* 7, 30 (1991), Kao et al, 46, 1349 (1986), Fridman et al, *Cancer Res.* 55, 2548 (1995), Ray et al, *Eur. Respir. J.* 7, 2062 (1994), Cottam et al, *Int. J. Oncol.* 2, 861 (1993), Tryggvason et al, *Breast Cancer Res. and Treatm.* 24, 209 (1993)]; Tumorzelloberflächenproteasen [surface expressed proteases = Seprase; Monsky et al, *Cancer Res.* 54 5702 (1994)]; Elastase [Kao et al, *Cancer Res.* 46, 1355 (1986)]; Prostata-spezifisches Antigen [Lundwall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 1151 (1989), Riegman et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 95 (1989)] oder pankreatische Trypsinogene [Miszuk-Jamska et al, *FEBS Lett.* 294, 175 (1991)].

Die Teilstruktur B des von dem erfindungsgemäßen Strukturgen kodierten Proteins stellt den eigentlichen erfindungsgemäßen Wirkstoff dar, der durch Spaltung der Teilstruktur C freigesetzt oder aktiviert und damit aus dem gehemmten Zustand (Protein BCD) in den aktiven Zustand (Protein B) überführt wird.

Dieser Wirkstoff kann entsprechend der Erfindung

- ein Enzym sein, welches eine biologische Aktivierungskaskade aktiviert und/oder aktiver Bestandteil dieser Kaskade ist. Derartige biologische Aktivierungskaskaden sind beispielsweise das Gerinnungssystem, das Komplementsystem oder das Kininsystem
- ein Enzym sein, welches die inaktive Vorstufe einer pharmakologischen Substanz überführt in die aktive Substanz
- oder eine pharmakologisch aktive Substanz darstellen.

Die Teilstruktur B' des von dem erfindungsgemäßen Strukturgen kodierten Proteins stellt den erfindungsgemäßen Liganden für die Bindung des Wirkstoffes (Protein B) an eine Zielstruktur dar.

Bevorzugte Zielstruktur ist die Oberfläche von Zellen, wie beispielsweise von Endothelzellen, Tumorzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten, Leberzellen, Nierenzellen oder Zellen anderer Gewebe und Organe.

Eine besonders bevorzugte Zielstruktur ist die Oberfläche von aktivierten und/oder proliferierenden Endothelzellen.

Eine weitere bevorzugte Zielstruktur sind Komponenten der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagene [Übersichten bei Prockop et al, *Annu. Rev. Biochem.* 64, 403 (1995), Wetzels et al, *Am. J. Pathol.* 139, 451 (1991)]; Ficolin [Ichijo et al, *J. Biol. Chem.* 268, 14505 (1993)]; Sialoprotein [Bellahcene et al, *Cancer Res.* 54,

2823 (1994)]; Laminin [von der Mark et al, Biochem. Biophys. Acta 823, 147 (1985); Hunt, Expl. Cell Biol. 57, 165 (1989)]; Proteoglykane (Schmidtchen et al., Biomed. Chromatography 7, 48 (1993)] oder Tenascin [Oyama et al, Cancer Res. 51, 4876 (1991); Herlyn et al, Cancer Res. 51, 4853 (1991)].

Der erfindungsgemäße Ligand (Teilstruktur B') kann sein

- ein Antikörper oder ein Antikörperfragment, wie beispielsweise Fab, Fv, single chain Fv oder Fc oder
- ein Peptid oder Protein, welches an einen Rezeptor auf der jeweiligen Zellmembran bindet. Hierzu gehören beispielsweise Cytokine, Wachstumsfaktoren, deren Rezeptor-bindende Teilsequenzen oder Peptidhormone oder
- ein Adhäsionsmolekül oder dessen Adhäsionssequenz, welche an ein korrespondierendes Molekül auf der Zellmembran oder auf der extrazellulären Matrix binden oder
- der zielzellbindende Teil oder das gesamte zielzellbindende Glykoprotein eines Virus oder
- ein Peptid mit Hilfe dessen der Wirkstoff in der Zellmembran der ihn exprimierenden Zelle verankert wird. Zu diesen verankernden Peptiden gehören beispielsweise Transmembrandomänen von Rezeptoren oder Virusproteinen oder aber Glykophospholipidanker.

Die Komponente d) kodiert für ein Peptid (Teilstruktur D), welches über die Teilstruktur C gebunden an das Protein B bzw. Protein B'B die Wirksamkeit des Proteins B inhibiert.

Die Komponente d) kann eine beliebige Nukleinsäuresequenz darstellen. Bevorzugt werden jedoch Nukleinsäuresequenzen, welche für körpereigene Peptide oder Proteine kodieren, um die Gefahr einer Immunreaktion zu vermeiden oder zu vermindern. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kodieren die im erfindungsgemäßen Strukturen enthaltenden Komponenten b) und d) körpereigene Proteine bzw. Peptide.

In der Natur kommt eine beträchtliche Zahl von Proteinwirkstoffen in Form inaktiver Vorstufen (Protein BSD) vor. Eine solche Vorstufe wird dadurch aktiviert, daß Enzyme diese Vorstufe in eine Teilstruktur, welche den aktiven eigentlichen Proteinwirkstoff darstellt (Protein B) und in eine inaktive Teilstruktur (Teilstruktur D) spaltet. Die Spaltung dieser Vorstufe erfolgt an mindestens einer definierten Aminosäuresequenz, der sogenannten Spaltsequenz (Teilstruktur S).

Es ist nun ein besonderer Gegenstand dieser Erfindung, diese natürlicherweise in Vorstufen von Proteinwirkstoffen vorkommende Spaltsequenz (Teilstruktur S) auszutauschen gegen die Teilstruktur C. Dieser Austausch erfolgt dadurch, daß in der Nukleinsäuresequenz, welche für die naturgemäße Vorstufe (Protein BSD) kodiert, die Sequenz, kodierend für die Teilstruktur S, ersetzt wird durch die Komponente c) (kodierend für Teilstruktur C). Nach Anfügung der Komponenten a) und ggf. b') entsteht ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt bestehend aus den Komponenten a)b')b)c)d) bzw. a)b)c)d), dessen Expressionsprodukt Protein B'BCD bzw. BCD in der Teilstruktur C durch Proteasen, gebildet in Tumoren oder sezerniert von Tumorzellen oder Entzündungszellen, gespalten wird, so daß der aktive Wirkstoff Protein B'B oder B entsteht.

Das erfindungsgemäße Genkonstrukt bestehend aus den Komponenten a)b)c)d) bzw. a)b')b)c)d) ist neu und kommt in dieser Form nicht in der Natur vor.

Das erfindungsgemäße Genkonstrukt wird, eingefügt in einen nichtviralen oder viralen Vektor, lokal verabreicht oder lokal oder in den Kreislauf injiziert zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen. Zu diesen Erkrankungen gehören insbesondere Tumorerkrankungen und Entzündungen. Derartige Entzündungen können beispielsweise durch physikochemische Schäden, durch eine Infektion oder durch eine Immunreaktion gegen körpereigenes oder fremdes Gewebe ausgelöst werden.

3) Nähere Beschreibung der Komponenten des erfindungsgemäßen Genkonstruktes

Die Auswahl der Komponenten des erfindungsgemäßen Genkonstruktes ist abhängig von der Erkrankung, welche durch Verabreichung des Genkonstruktes therapiert werden soll.

3.1) Promotorsequenzen [Komponente a)]

Im Sinne der Erfindung sind folgende Promotorsequenzen [Komponente a)] im erfindungsgemäßen Genkonstrukt einzusetzen:

- a) uneingeschränkt aktivierbare Promotoren und Aktivatorsequenzen, wie beispielsweise
 - der Promotor der RNA-Polymerase III
 - der Promotor der RNA-Polymerase II
 - der CMV-Promotor und -Enhancer
 - der SV40 Promotor
- b) virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, wie beispielsweise
 - HBV
 - HCV
 - HSV
 - HPV
 - EBV
 - HTLV
 - HIV

Bei Verwendung des HIV-Promotors ist die gesamte LTR-Sequenz einschließlich der TAR-Sequenz [Position ≤

–453 bis \geq –80, Rosen et al, Cell 41,813 (1985)] als virusspezifischer Promotor einzusetzen.

- c) Metabolisch aktivierbare Promotor- und Enhancersequenzen, wie beispielsweise der durch Hypoxie induzierbare Enhancer
- d) Zellzyklus-spezifisch aktivierbare Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des odc25C Gens, des Cyclin A Gens, des cdc2 Gens, des B-myb Gens, des DHFR-Gens oder des E2F-1 Gens.
- e) Tetrazyklin aktivierbare Promotoren, wie beispielsweise der Tetrazyklin-Operator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor.

Im Sinne der Erfindung sind als Promotorsequenzen Nukleotidsequenzen zu verwenden, welche nach Bindung von Transkriptionsfaktoren die Transkription eines am 3' Ende benachbart gelegenen Strukturgenes aktivieren.

- f) Zellspezifisch aktivierbare Promotoren Hierzu zählen bevorzugt Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine bevorzugt in ausgewählten Zellen kodieren.

Zum Beispiel sind im Sinne der Erfindung in folgenden Zellen Promotoren für folgende Proteine bevorzugt zu verwenden:

- f.1) Promotor- und Aktivatorsequenzen aktiviert in Endothelzellen
 - Hirn-spezifischer, endothelialer Glucose-1-Transporter
 - Endoglin
 - VEGF-Rezeptor-1 (flt-1)
 - VEGF-Rezeptor-2 (flk-1, KDR)
 - til-1 oder til-2
 - B61-Rezeptor (Eck-Rezeptor)
 - B61
 - Endothelin, im speziellen
 - Endothelin B
 - Endothelin-1
 - Endothelin-Rezeptoren, insbesondere der Endothelin B-Rezeptor
 - Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren
 - von Willebrand Faktor
 - II-1 α , II-1 β
 - II-1-Rezeptor
 - Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1)
 - synthetische Aktivatorsequenzen

Als Alternative zu natürlichen endothelzellspezifischen Promotoren lassen sich auch synthetische Aktivatorsequenzen verwenden, die aus oligomerisierten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die preferentiell oder selektiv in Endothelzellen aktiv sind, bestehen. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor GATA-2, dessen Bindestelle im Endothelin-1 Gen 5'-TTATCT-3' ist [Lee et al, Biol. Chem. 266, 16188 (1991), Dormann et al, J. Biol. Chem. 267, 1279 (1992) und Wilson et al, Mol. Cell Biol. 10, 4854 (1990)].

- f.2) Promotoren oder Aktivatorsequenzen, aktiviert in Zellen in Nachbarschaft aktivierter Endothelzellen, insbesondere in glatten Muskelzellen.
 - VEGF

Die genregulatorischen Sequenzen für das VEGF-Gen sind

- die 5' flankierende Region
- die 3' flankierende Region
- das c-Src-Gen
- das v-Src-Gen
- Steroid-Hormonrezeptoren und deren Promotorelemente, insbesondere der Maus-Mammatumori-Virus-Promotor
- Tropomyosin
- α -Actin
- α -Myosin
- Rezeptor für PDGF
- Rezeptor für FGF
- MRF-4
- Phosphofructokinase A
- Phosphoglyceratmutase
- Troponin C
- Myogenen
- Rezeptoren für Endothelin A

- Desmin
- "artifizielle" Promotoren

5 Faktoren der Helix-Loop-Helix (HLH)-Familie (MyoD, Myf-5, Myogenin, MRF4 [Übersicht in Olson and Klein, Genes Dev. 8, 1(1994)]) sind als muskelspezifische Transkriptionsfaktoren beschrieben. Des weiteren gehören zu den muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren das Zinkfingerprotein GATA-4 [Arceci et al, Mol. Cell Biol. 13, 2235 (1993), Ip et al, Mol. Cell Biol. 14, 7517 (1994)] sowie die Gruppen der MEF-Transkriptionsfaktoren [Yu et al, Gene Dev. 6, 1783 (1992)].

10 Die HLH-Proteine sowie GATA-4 zeigen muskelspezifische Transkription nicht nur mit Promotoren von muskelspezifischen Genen, sondern auch im heterologen Kontext, so auch mit artifiziellen Promotoren. Derartige artifizielle Promotoren sind beispielsweise:

- multiple Kopien der (DNA) Bindestelle für muskelspezifische HLH-Proteine wie der E-Box (Myo D) (z. B. 4 × AGCAGGTGTTGGGAGGC) [Weintraub et al, PNAS 87, 5623 (1990)]
 - 15 — multiple Kopien der DNA Bindestelle für GATA-4 des α -Myosin-Heavy Chain Gens (z. B. 5'-GGCCGATGGGCAGATAGAGGGGGCCGATGGGCAGATAGAGG3') [Molkentin et al, Mol. Cell Biol. 14, 4947 (1994)].
- f.3) Promotoren und Aktivatorsequenzen aktiviert in Leukämiezellen.

20 Hierzu gehören beispielsweise Promotoren für

- c-myc
 - HSP-70
 - bcl-1/cyclin D-1
 - 25 — bcl-2
 - IL-6
 - IL-10
 - TNF α , TNF β
 - HOX-11
 - 30 — BCR-Abl
 - E2A-PBX-1
 - PML-RATA
- f.4) Promotoren oder Aktivatorsequenzen aktiviert in Tumorzellen.

35 Als Promotor- oder Aktivatorsequenz ist eine genregulatorische Nukleotidsequenz vorgesehen, mit der Transkriptionsfaktoren, gebildet oder aktiv in Tumorzellen, interagieren.

Im Sinne dieser Erfindung zählen zu den bevorzugten Promotoren oder Aktivatorsequenzen genregulatorische Sequenzen bzw. Elemente aus Genen, die besonders in Krebszellen oder Sarkomzellen gebildete Proteine kodieren. So wird bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen beispielsweise der Promotor des N-CAM-Proteins, bei Ovarialkarzinomen der Promotor des "Hepatitis growth factor"-Rezeptors oder des L-Plastin und bei Pankreas-

40 karzinomen der Promotor des L-Plastins oder des polymorphen epithelialen Mucins (PEM) verwendet.

f.5) Promotoren und Aktivatorsequenzen, aktiviert in Gliazellen.

45 Hierzu zählen im besonderen die genregulatorischen Sequenzen bzw. Elemente aus Genen, die beispielsweise für folgende Proteine kodieren:

- das Schwannzell-spezifische Protein Periaxin
- Glutaminsynthetase
- 50 — das Gliazell-spezifische Protein (Glial fibrillary acid protein = GFAP)
- das Gliazellprotein S100b
- IL-6 (CNTF)
- 5-HT-Rezeptoren
- TNF α
- 55 — IL-10
- Insulin-like Growth Factor Receptor I and II
- VEGF

Die genregulatorischen Sequenzen für das VEGF-Gen sind bereits oben aufgeführt worden.

60 f.6) Promotoren und Aktivatorsequenzen aktiviert in Lymphozyten und/oder Makrophagen.

Hierzu gehören beispielsweise die Promotor- und Aktivatorsequenzen der Gene für Cytokine, Cytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren für das Fc-Fragment von Antikörpern.

Hierzu gehören beispielsweise:

- 65 — IL-1-Rezeptor
- IL-1 α
- IL-1 β

- IL-2
 - IL-2-Rezeptor
 - IL-3
 - IL-3-Rezeptor (α -subunit)
 - IL-3-Rezeptor (β -subunit) 5
 - IL-4
 - IL-4-Rezeptor
 - IL-5
 - IL-6
 - IL-6-Rezeptor 10
 - Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) (Der Promotor von IRF-1 wird durch IL-6 gleichermaßen aktiviert wie durch IFN γ oder IFN β .)
 - IFN γ Responsive Promotor
 - IL-7
 - IL-8 15
 - IL-10
 - IL-11
 - IFN γ
 - GM-CSF
 - GM-CSF-Rezeptor (α -Kette) 20
 - IL-13
 - LIF
 - Makrophagen-Colony Stimulating Factor (M-CSF)-Rezeptor
 - Typ I und II Makrophagen Scavenger Rezeptoren
 - MAC-1 (Leukozytenfunktionsantigen) 25
 - LFA-1 α (Leukozytenfunktionsantigen)
 - p150,95 (Leukozytenfunktionsantigen)
- f.7) Promotor- und Aktivatorsequenzen aktiviert in Synovialzellen.

Hierzu gehören die Promotorsequenzen für Matrix-Metalloproteinasen (MMP), beispielsweise für: 30

- MMP-1 (interstitielle Kollagenase)
- MMP-3 (Stromelysin/Transin)

Hierzu gehören des weiteren die Promotorsequenzen für Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP), 35
beispielsweise

- TIMP-1
- TIMP-2
- TIMP-3 40

f.8) Im Sinne der Erfindung können mehrere der beispielhaft aufgeführten Promotorsequenzen miteinander kombiniert werden, um eine möglichst hohe Zielzellspezifität in der Expression des erfindungsgemäßen Genkonstruktes zu erreichen. Es kann auch die Kombination zweier gleicher Promotoren erfolgen.

Eine Kombination von mehreren Promotorsequenzen kann beispielsweise erfolgen über: 45

- chimäre Promotoren

Ein chimärer Promotor stellt die Kombination einer stromaufwärts gelegenen zellspezifisch, metabolisch oder virusspezifisch aktivierbaren Aktivatorsequenz mit einem stromabwärts gelegenen Promotormodul dar, welches die Transkriptionsfaktoren der Familien CDF und CHF oder E2F und CHF binden und 50
hierdurch die Aktivierung der stromaufwärts gelegenen Aktivatorsequenz in G₀- und G₁-Phase des Zellzyklus hemmen kann [Lucibello et al, EMBO J. 14, 132 (1994), PCT/GB95/02000].

– Hybride Promotoren, beispielsweise in der Form, daß die TATA-Box eines Promotors mutiert ist, wobei diese Mutation durch eine korrespondierende Mutation im Gen eines TATA-Bindeproteins kompensiert wird und dieses TATA-Bindeprotein unter der Kontrolle eines weiteren Promotors steht. 55

3.2) Nukleinsäuresequenz [Komponente b')] kodierend für einen Liganden (Teilstruktur B')

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der Ligand eine Substanz, welche ein Membranantigen an einen Rezeptor oder an ein Adhäsionsmolekül auf der Zielzelle bindet oder in der Zellmembran integriert ist und/oder 60
an die extrazelluläre Matrix bindet. [Übersicht über die wesentlichen Cytokine und Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix-Proteine bei von Ayad et al, The Extracellular Matrix, Academic Press 1994; Callard et al, The Cytokine, Academic Press 1994; Pigott et al, The Adhesion Molecule, Academic Press 1994, Barclay et al, The Leucocyte Antigen, Academic Press 1994].

An Rezeptoren bindende Substanzen sind beispielsweise: 65

- Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF, EGF, TGF α , TGF β , KGF, SDGF, FGF, IGF, HGF, NGF, BDNF, Neurotrophine, BMF, Bombesin, M-CSF, Thrombopoietin, Erythropoietin, SCF, SDGF, Oncostatin,

PDEGF, Endothelin-1

— Cytokine wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15

— Interferon α , β und γ

— Tumornekrosisfaktoren TNF α , - β

— Chemokine wie RANTES, MCAF, MIP-1 α oder - β , NAP, β -Thromboglobulin

— Peptidhormone wie SRH, SIH oder STH, MRH oder MSH, PRH, PIH oder Prolaktin, LH-RH, FSH-RH, LH/ICSH oder FSH, TRH oder TSH, CRH oder ACTH

— Angiotensin, Kinine, Homologe oder Analoge hiervon

— Vitamine wie z. B. Folsäure

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann der Ligand auch ein Adhäsionsmolekül, ein Teil des Adhäsionsmoleküls oder ein Analogon eines Adhäsionsmoleküls sein, welches an ein korrespondierendes zellmembranständiges Adhäsionsmolekül oder an eine andere spezifische Bindestruktur für ein Adhäsionsmolekül auf der Zielzelle oder der extrazellulären Matrix bindet.

Derartige als Liganden funktionsfähige Adhäsionsmoleküle sind beispielsweise

— Lewis X (für GMP-140)

— S-Lewis X (für ELAM-1)

— LFA-1 (für ICAM-1 und ICAM-2)

— MAC-1 (für ICAM-1)

— VLA-4 (für VCAM-1)

— PECAM (für PECAM)

— Vitronectin (für den Vitronectinrezeptor)

— GMP-140 (für Lewis X)

— S-Lewis X (für ELAM-1)

— ICAM-1, ICAM-2 (für LFA-1, MAC-1)

— VCAM-1 (für VLA-4)

— Fibronectin (für VLA-4)

— Laminin (für VLA-6)

— Fibronectin, Laminin (für VLA-1, VLA-2, VLA-3)

— Fibronectin (für VLA-4)

— Fibrinogen (für GPIIb-IIIa)

— B7 (für CD28)

— CD28 (für B7)

— CD40 (für CD40L)

— CD40L (für CD40)

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann der Ligand auch der extrazelluläre Teil eines Fc-Rezeptors sein [Dougherty et al, Transfusion Science 17 121(1996)].

Des weiteren kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung der Ligand auch ein Antikörpermolekül oder der epitopbindende Teil eines Antikörpermoleküls sein.

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. [Nature 349, 293 (1991)] und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 1993)] dargestellten Weise.

Rekombinante Antikörperfragmente werden direkt aus existierenden Hybridomen hergestellt oder werden mit Hilfe der "phage display"-Technologie [Smith, Science 228, 1315 (1985)] aus Bibliotheken muriner bzw. Humaner Antikörperfragmente isoliert [Winter et al, Annu. Rev. Immunol. 12, 433 (1994)]. Diese Antikörperfragmente werden dann auf genetischer Ebene direkt für weitere Manipulationen (z. B. der Fusion mit anderen Proteinen) eingesetzt.

Zur Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten aus Hybridomen wird die genetische Information, die für die antigenbindenden Domänen (VH, VL) der Antikörper kodiert, durch Isolierung der mRNA, die reverse Transkription der RNA in cDNA und die anschließende Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion [Saiki et al, Science 230, 1350 (1985)] und Oligonukleotiden komplementär zu den 5'-bzw. 3'-Enden der variablen Fragmente [Orlandi et al, 1989] gewonnen. Die VH- und VL-Fragmente werden dann in bakterielle Expressionsvektoren z. B. in Form von Fv-Fragmenten [Skerra & Plückthun, Science 240, 1038 (1988)], einzelkettigen Fv-Fragmenten (scFv) [Bird et al, Science 242, 423 (1988)], Huston et al, PNAS-USA 85, 5879 (1988)] oder als Fab-Fragmente [Better et al, Science 240, 1041 (1988)] kloniert.

Neue Antikörperfragmente können mittels der "phage-display"-Technologie auch direkt aus Antikörperbibliotheken (Immunbibliotheken, naive Bibliotheken) murinen oder humanen Ursprungs isoliert werden. Beim "phage display" von Antikörperfragmenten werden die antigenbindenden Domänen als Fusionsproteine mit dem Hüllprotein g3P filamentöser Bakteriophagen entweder in das Phagengenom [McCafferty et al, Nature 348, 552 (1990)] oder in Phagemid-Vektoren [Breitling et al, Gene 104, 147 (1991)] in Form von scFv-Fragmenten [McCafferty et al, Nature 348, 552 (1990)] oder als Fab-Fragmente [Hoogenboom et al, Nucl. Acid Res. 19, 4133 (1991), Barbas et al, PNAS-USA 88, 7978 (1991)] kloniert. Antigen-bindende Phagen werden an antigenbeladenen Plastikgefäßen (panning) [Marks et al, J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)], an antigenkonjugierten, paramagnetischen "beads" [Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226, 889 (1992)] oder durch Bindung an Zelloberflächen [Marks et al, Bio/Technol. 11, 1145 (1993)] selektioniert.

Immunbibliotheken werden hergestellt durch PCR-Amplifikation der variablen Antikörperfragmente aus

B-Lymphozyten immunisierter Tiere [Sastry et al, PNAS-USA 86, 5728 (1989), Ward et al, Nature 341, 544 (1989), Clackson et al, Nature 352, 624 (1991)] oder Patienten [Mullinax et al, PNAS-USA 87, 8095 (1990), Barbas et al, PNAS-USA 88, 7978 (1991)]. Dazu werden Kombinationen von Oligonukleotiden die spezifisch sind für murine [Orlandi et al, PNAS-USA 86, 3833 (1989), Sastry et al, PNAS-USA 86, 5728 (1989)] oder humane Immunglobulingene [Larrick et al, BBRC 160, 1250 (1989)] bzw. für die humanen Immunglobulin-Genfamilien [Marks et al, Eur. J. Immunol. 21, 985 (1991)] verwendet.

Unter Verwendung nichtimmunisierter Spender als Quelle der Immunglobulingene lassen sich naive Bibliotheken herstellen [Marks et al, J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)]. Alternativ können Immunglobulin-Keimbahngene zur Herstellung semisynthetischer Antikörperrepertoires eingesetzt werden, wobei die Komplementarität bestimmende Region 3 der variablen Fragmente durch PCR mit Hilfe degenerierter Primer ergänzt wird [Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1992), Barbas et al, PNAS-USA 89, 4457 (1992), Nissim et al, EMBO J. 13, 692 (1994), Griffiths et al, EMBO J. 13, 3245 (1994)]. Diese sogenannten "single pot"-Bibliotheken haben gegenüber Immunbibliotheken den Vorteil, daß Antikörperfragmente gegen eine Vielzahl von Antigenen aus einer einzigen Bibliothek isoliert werden können [Nissim et al, EMBO J. 13, 692 (1994)].

Die Affinität von Antikörperfragmenten kann mittels der "phage display"-Technologie weiter erhöht werden, wobei neu Bibliotheken von bereits existierenden Antikörperfragmenten durch zufällige [Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226, 889 (1992), Gram et al, PNAS-USA 89 3576 (1992)], kodonbasierende [Glaser et al, J. Immunol. 149, 3903 (1992)] oder gezielte Mutagenese [Balint & Larrick, Gene 137, 109 (1993)], durch "chain shuffling" einzelner Domänen mit Fragmenten aus naiven Repertoires [Marks et al, Bio/Technol. 10, 779 (1992)] oder unter Zuhilfenahme von bakteriellen Mutatorstämmen [Low et al, J. Mol. Biol. 260, 359 (1996)] hergestellt werden und durch Reselektion unter stringenten Bedingungen [Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226, 889 (1992)] Antikörperfragmente mit verbesserten Eigenschaften isoliert werden. Zusätzlich können murine Antikörperfragmente durch stufenweisen Austausch einer der variablen Domänen gegen ein humanes Repertoire und anschließende Selektion mit dem ursprünglichen Antigen ("guided selection") [Jespers et al, Bio/Technol. 12, 889 (1994)] humanisiert werden. Alternativ erfolgt die Humanisierung muriner Antikörper durch zielgerichteten Austausch der hypervariablen Regionen humaner Antikörper durch die korrespondierenden Regionen des originalen murinen Antikörpers [Jones et al, Nature 321, 522 (1987)].

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann der Ligand auch die Nukleotidsequenz kodierend für ein Hüllprotein oder einen Teil des Hüllproteins von Viren darstellen, welche über ihr Hüllprotein an ausgewählte Zellen spezifisch binden.

Des weiteren kann der Ligand ein Peptid sein, mit Hilfe dessen der Wirkstoff (Protein B) in der Zellmembran der in exprimierenden Zellen verankert wird.

Zu diesen verankernden Peptiden gehören

- Transmembrandomänen von zellmembranständigen Rezeptoren oder von Virusproteinen wie beispielsweise die Transmembransequenz des menschlichen Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktors [DNA-Position ≤ 1485 bis ≥ 1554 ; Cosman et al, Behring Inst. Mitt. 83, 15 (1988)] oder die DNA-Sequenz für die Signal- und Transmembranretion des menschlichen Respiratory Syncytial Virus (RSV)-Glykoproteins G [Aminosäuren 1 bis 63 oder deren Teilsequenzen, Aminosäuren 38 bis 63; Vijaya et al, Mol. Cell Biol. 8, 1709 (1988); Lichtenstein et al, J. Gen. Virol. 77, 109 (1996)] oder die DNA-Sequenz für die Signa- und Transmembranregion der Influenzavirus-Neuraminidase [Aminosäuren 7 bis 35 oder die Teilsequenz Aminosäuren 7 bis 27, Brown et al, J. Virol. 62, 3824 (1988)].

- Zur Verankerung des Wirkstoffes in die Zellmembran der den Wirkstoff bildenden transduzierten Zellen kann jedoch auch die Nukleotidsequenz für einen Glykophospholipid-Anker [Übersicht über Glykophospholipid verankerte Membranproteine bei Ferguson et al (Ann. Rev. Biochem. 57, 285 (1988))] eingefügt werden.

Glykophospholipid-Anker sind beispielsweise für das CEA [DNA-Position <893 bis >1079; Berling et al, Cancer Res. 50, 6534 (1990)], für das N-CAM [Cunningham et al, Science 236, 799 (1987)] und für weitere Membranproteine wie beispielsweise Thy-1 [Clissold, Biochem. J. 281, 129 (1992)] oder CD16 [Selvaray et al, Nature 333, 565 (1988)] beschrieben worden.

Die Wahl des Liganden richtet sich nach der Zielzelle, welche durch das Genkonstrukt transduziert werden soll.

Als Beispiele hierfür gelten:

a) Liganden für aktivierte Endothelzellen

Hierzu gehören im Sinne der Erfindung Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Endothelzellen wie sie beispielsweise von Burrows et al [Pharmac. Ther. 64, 155 (1994), Hughes et al (Cancer Res. 49 6214 (1989) und Maruyama et al (PNAS-USA 87, 5744 (1990))] beschrieben wurden. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen Actin, Angiotensin II-Rezeptoren, Antikörper gegen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF, PDGF oder EGF und Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise gegen den Vitronectinrezeptor oder ICAM-3.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Endothelzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu IL-1 oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Endothelzellen binden, wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, TGF β [Pusztain et al, J. Pathol. 169, 191 (1993)].

Des weiteren gehören hierzu Adhäsionsmoleküle, welche an aktivierte und/oder proliferierende Endothelzel-

len binden. Derartige Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise Slex, LFA-1, MAC-1, LECAM-1, VLA-4 oder Vitronectin wurden bereits beschrieben [Übersichten bei Augustin-Voss et al., J. Cell Biol. 119, 483 (1992), Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175 (1990), Honn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353 (1992), Pigott et al., The Adhesion Molecule, Academic Press (1994)].

5 Zu den Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören insbesondere Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für Endothelzellen haben. Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

- Filoviren, beispielsweise
 - das Marburg-Virus mit seinem Hüllprotein GP (glycoprotein) und sGP (second glycoprotein)
 - oder das Ebola-Virus jeweils mit seinem Hüllprotein GP und sG
- das Cytomegalovirus besonders mit seinem gB-Protein
- das Herpes Simplex-Virus Type I
- das HIV-1 Virus
- das Masern-Virus
- 15 — das Hantaan-Virus
- Alphaviren, wie Semliki Forest-Virus
- das Virus des epidemischen, haemorrhagischen Fiebers
- das Poliovirus
- Enteroviren (wie z. B. Echo 9, Echo 12, Cochsackie B3)

20 b) Liganden für Muskelzellen

Hierzu gehören beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Muskelzellen, insbesondere von glatten Muskelzellen. Derartige Antikörper sind beispielsweise

- 25 — der Antikörper 10F3 oder
- Antikörper gegen Actin oder
- Antikörper gegen Angiotensin II-Rezeptoren oder
- Antikörper gegen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder
- 30 — Antikörper gerichtet beispielsweise gegen
 - EGF-Rezeptoren
 - oder gegen PDGF-Rezeptoren
 - oder gegen FGF-Rezeptoren
 - oder Antikörper gegen Endothelin A-Rezeptoren.

35 Zu den Liganden gehören des weiteren Nukleotidsequenzen für Wirksubstanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Muskelzellen binden [Übersicht bei Pusztai et al., J. Pathol. 169, 191 (1993), Harris, Curr. Opin. Biotechnol. 2, 260 (1991)]. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch glatte Muskelzellen binden wie

- 40 — PDGF
- EGF
- TGF β
- 45 — TGF α
- FGF
- Endothelin A

50 Zu den Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Muskelzellen haben. Zu diesen Viren gehört beispielsweise das Cytomegalovirus [Speir et al., Science 265, 391 (1994)].

c) Liganden für aktivierte Makrophagen und/oder aktivierte Lymphozyten

55 Zu den Liganden im Sinne der Erfindung gehören des weiteren Nukleotidsequenzen für Substanzen, welche an die Oberfläche von Immunzellen spezifisch binden. Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Immunzellen, wie sie beispielsweise von Powelson et al., Biotech. Adv. 11, 725 (1993) und Barclay et al., The Leucocyte Antigen, Academic Press (1994) beschrieben wurden.

60 Des weiteren gehören zu den Liganden auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihrem antigenbindenden variablen Teil an Fc- γ - oder Fc- ϵ - oder Fc- μ Rezeptoren von Immunzellen binden [Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)].

Des weiteren gehört hierzu das Fc-Fragment von humanem monoklonalem oder polyklonalem Immunglobulin.

65 Zu den Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen binden. Hierzu gehören Zytokine wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , GM-CSF, M-CSF des weiteren Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF, TGF, FGF, IGF oder PDGF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Immunzellen binden [Callard et al., The Cytokine, Academic Press (1994)].

Hierzu gehören des weiteren Adhäsionsmoleküle und andere Liganden, welche an Zellmembranstrukturen, auf Makrophagen in Milz, Leber, Lunge und andere Gewebe binden [Pigott et al, The Adhesion Molecule, Academic Press (1994), Perales et al, Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994)].

Zu den Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Lymphozyten und/oder Makrophagen haben.

Zu diesen Makrophagen infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- HIV-1
besonders solche Stämme mit Mutationen in der V3-Region von gp120, die zu einer erhöhten Bindung an Makrophagen führen 10
- HIV-2
- Hantaviren, beispielsweise des Puumalavirus
- Cytomegalovirus
- Respiratory Syncytial Virus
- Herpes simplex-Virus 15
- Filoviren

Zu den Lymphozyten infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- Varizella-Zoster-Virus (VZV); 20
- VZV infiziert besonders T-Zellen Herpes Virus 6 (HHV-6);
- HHV-6 infiziert besonders T-Zellen
- Rabies-Virus;
- das Rabies-Virus Hüllprotein bindet besonders an TH2-Zellen
- HIV-1; 25
- das Glykoprotein gp120 bindet bevorzugt an das CD4 Molekül von T-Zellen
- HTLV-II;
- HTLV-II infiziert besonders B-Zellen
- HTLV-I;
- HTLV-I infiziert besonders T-Zellen 30
- Influenza C-Viren;
- Influenza-C-Viren binden über das Haemagglutinin-Esternse-Fusions-(HEF) Protein an N-acetyl-9- β -acetylneuraminsäure (Neu 5,9 Ac), welche bevorzugt auf B-Lymphozyten, weniger oder nicht auf T-Lymphozyten vorkommt
- Influenza C-Viren mit Mutation in der Nukleotidposition 872 (die die Position 284 des HEF der Aminosäuresequenz kodiert), beispielsweise ein Austausch des Threonins durch Isoleucin. Das Oberflächenprotein HEF mit dieser Mutation hat eine deutlich stärkere Affinität zum N-acetyl-9-O-acetylneuraminsäure-Rezeptor als das Wildvirus 35
- HEF Spaltprodukte des Influenza C-Virus, welche die Bindestruktur für N-acetyl-9- β -acetylneuraminsäure enthalten. Diese Bindestruktur ist definiert durch die katalytische Triade Serin-71, Histidin 368 oder -369 und Asparaginsäure 261 40
- Epstein-Barr Virus;
- EBV infiziert besonders B-Zellen
- Herpes simplex-Virus-2;
- HSV-2 infiziert besonders T-Zellen 45
- Masernvirus

d) Liganden für Synovialzellen und Entzündungszellen

Hierzu gehören Nukleinsäuresequenzen für Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren variablen Domänen an Membranstrukturen von Synovialzellen oder Entzündungszellen binden. Solche Membranstrukturen sind beispielsweise 50

- Vimentin [Miettinen et al, Am. J. Pathol. 117,18 (1984)]
- Fibronectin [Wojciak et al, Clin. Exp. Immunol. 93, 108 (1993)] oder Fc-Rezeptoren. 55

Hierzu gehören auch Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc-Rezeptor binden [Rojanasakul et al, Pharm. Res. 11, 1731 (1994)].

Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Synovialzellen binden. Beispielsweise gehören hier Cytokine oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Synovialzellen binden wie beispielsweise IL-1-RA, TNF α , IL-4, IL-6, IL-10, IGF, TGF β [Callard et al, The Cytokine, Academic Press (1994)]. 60

e) Liganden für mit Viren infizierte Zellen

Zu den Liganden gehören Nukleinsäurekonstrukte für Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen die Virusantigene exprimiert auf der Zellmembran von virusinfizierten Zellen. 65

Derartige Antikörper sind beispielsweise gegen Antigene folgender Viren gerichtet:

- HBV
- HCV
- HSV
- HPV
- HIV
- EBV
- HTLV

f) Liganden für Leberzellen und weitere Gewebezellen

Zu den Liganden gehören alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie Zytokine, EGF, TGF, FGF oder PDGF, oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch derartige Zellen binden.

Hierzu gehören des weiteren Liganden, welche an Zellmembranstrukturen binden, welche selektiv sind für bestimmte Gewebe. Hierzu zählen beispielsweise:

Membranstruktur	Ligand	Gewebezellen
Transferrin-Rezeptor	Transferrin	Leber, andere Gewebezellen
Insulin-Rezeptor	Insulin	Leber, andere Gewebezellen
Fc-γ-Rezeptoren	Immunglobulin G	retikuloendotheliales System, andere Gewebe

Diese Liganden und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al, Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994) beschrieben.

Zu den Liganden im Sinne der Erfindung gehören jedoch besonders Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für ausgewählte Zellen haben, wie beispielsweise für

g) Bronchialepithelzellen

- Respiratory syncytial virus

h) Leberzellen

- Hepatitis C-Virus
- Filoviren
- Leberzellen binden z. B. das Marburg-Virus über den Asialoglykoprotein-Rezeptor
- Hepatitis B-Virus
- Leberzellen binden bevorzugt über den Asialoglykoprotein-Rezeptor an der preS2 und preS1 Domäne von HBV
- Hepatitis D-Virus
- Lebersinusoidale Zellen
- Hepatitis V-Virus
- HBV wird gebunden über Fibronectin

i) Liganden für Gliazellen

Hierzu gehören Nukleinsäuresequenzen kodierend für Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Gliazellen, wie sie beispielsweise von Mirsky et al. [Cell and Tissue Res. 240, 723 (1985)], Coakham et al. [Prog. Exp. Tumor Res. 29, 57 (1985)] und McKeever et al. [Neurobiol. 6, 119 (1991)] berichtet wurden. Zu diesen Membranstrukturen gehören des weiteren Neuraladhäsionsmoleküle wie N-CAM, insbesondere dessen Polypeptidkette C [Nybroe et al., J. Cell Biol. 101, 2310 (1985)].

Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Gliazellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Insulin und Insulin-like growth factor und diejenigen Fragmente dieser Wachstumsfaktoren, welche an die zugehörigen Membranrezeptoren binden.

Zu den Liganden im Sinne der Erfindung gehören des weiteren Nukleinsäuresequenzen kodierend für Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Gliazellen haben.

Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

- HIV-1 Subtyp JRF1

— Herpes simplex-Virus I

k) Liganden für Leukämiezellen

Hierzu gehören Nukleinsäurekonstrukte kodierend für Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische Verfahren beschrieben worden [Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990); Drexler et al, Leuk. Res. 10, 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989); Stickney et al, Curr. Opin. Oncol. 4, 847 (1992); Drexler et al, Blut 57 327 (1988); Freedman et al, Cancer Invest. 9, 69 (1991)]. Je nach Typ der Leukämie sind die Liganden beispielsweise monoklonale Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente folgender Spezifität geeignet:

Zellen	Membranantigen	
AML	CD13 CD14 CD15 CD33 CAMAL Sialosyl-Le	15 20
B-CLL	CD5 CD1c CD23 Idiotypen und Isotypen der Membran- immunglobuline	25 30
T-CLL	CD33 M38 IL-2-Rezeptor T-Zell-Rezeptoren	 35
ALL	CALLA CD19 Non-Hodgkin Lymphoma	 40

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren von Leukämiezellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Leukämiezellen binden.

Derartige Wachstumsfaktoren wurden bereits beschrieben [Übersichten bei Cross et al, Cell. 64, 271(1991); Aulitzky et al, Drugs 48, 667 (1994); Moore, Clin. Cancer Res. 1, 3 (1995); Van Kooten et al, Leuk. Lymph. 12, 27 (1993)]. Beispielsweise gehören zu ihnen:

- IFN α bei Non-Hodgkin Lymphomen
- IL-2, besonders bei T-Zell-Leukämien FGF bei T-Zell-, monozytären, myeloiden, erythroiden und megakaryoblastischen Leukämien
- TGF β bei Leukämien
- Retinoide, z. B. "Retinoic acid" bei akuter promyelozytärer Leukämie

l) Liganden für Tumorzellen

Hierzu gehören Nukleinsäuresequenzen kodierend für Antikörper und Fragmente dieser Antikörper, gerichtet gegen Membranstrukturen auf Tumorzellen. Derartige Antikörper wurden zum Beispiel von Sedlacek et al, Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992) übersichtlich dargestellt.

Weitere Beispiele stellen dar Antikörper gegen:

- Sialyl Lewis
- Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden
- von Onkogenen exprimierte Proteine

- Ganglioside wie GD3, GD2, GM2, 9-O-acetyl GD3, Fucosyl GM1
- Blutgruppenantigene und deren Vorläufer
- Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin
- Antigene auf Heat Shock Proteinen

3.3) Nukleinsäuresequenz [Komponente b)] kodierend für einen Wirkstoff (Protein B)

Der Wirkstoff (Protein B) entsprechend der Erfindung ist eine Substanz, welche beispielsweise in eine biologische Aktivierungskaskade eingreift und/oder aktiver Bestandteil dieser Kaskade ist. Hierzu gehören Wirkstoffe, welche

a) die Gerinnungskaskade aktivieren, beispielsweise:

- Thrombin [MacGillivray et al, Ann. N. Y. Acad. Sci. 485, 73 (1986)]
- Thrombin, mutiert im Bereich der Spaltstelle Arg-Thr (Aminosäureposition 327/328)
- Faktor Va [Cripe et al, Biochem. 31, 3777 (1992), Jenny et al, PNAS USA 84, 4846 (1987)]
- Faktor VIIa [O'Hara et al, PNAS USA 84, 5158 (1987)]
- Faktor IXa [Yoshitake et al, Biochem 24 3736 (1985)]
- Faktor Xa [Messier et al, Gene 99, 291 (1991)]
- Tissue factor und gerinnungsaktive Fragmente von ihm [Morrissey et al, Cell 50, 29 (1987); Scarpati et al, Biochem. 26, 5234 (1987); Spicer et al, PNAS USA 84, 5148 (1987); Rehemtulla et al, Thromb. Haemost. 65, 521 (1991)]

b) die Gerinnungskaskade inhibieren oder die Fibrinolyse aktivieren, beispielsweise

- die Plasminogenaktivatorinhibitoren PAI-1 PAI-2, PAI-3

- Hirudin

- Protein C

- Serin-Proteinase-Inhibitoren, wie beispielsweise

- C-1S Inhibitor
- α 1-Antritypsin
- Antithrombin III

- Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

- Plasminogenaktivatoren wie Urokinase, Tissue Plasminogenaktivator (tPA) oder Hybride hiervon

c) die Komplementkaskade aktivieren, beispielsweise

- Cobra venom factor (CVF) oder Teilsequenzen vom CVF, welchem dem menschlichen Komplementfaktor C3b funktionell entsprechen, d. h. welche an den Komplementfaktor B binden können und nach Spaltung durch den Faktor D eine C3 Konvertase darstellen. Die DNA-Sequenz für CVF und seiner Teilsequenzen wurden von Fritzinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12775 (1994) veröffentlicht.

- der menschliche Komplementfaktor C3b. Die DNA-Sequenz für C3 und seiner Teilsequenzen wurde von De Bruijn et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 708 (1985) publiziert.

- Spaltprodukte des menschlichen Komplementfaktors C3, welche funktionell und strukturell dem CVF ähneln. Derartige Spaltprodukte wurden von O'Keefe et al, J. Biol. Chem. 263, 12690 (1988) beschrieben.

d) das Kinin-, Komplement- und/oder Gerinnungssystem aktivieren, beispielsweise

- der aktivierte Hagemann Faktor (F XIIa) [Shibuya et al, Biochem. Biophys. Acta 1206, 63 (1994), Que et al, Biochem. 25, 1525 (1986), Tripodi et al, Nucl. Acid Res. 14, 3146 (1986)]
- Kallikrein [Chen et al, Biochem. J. 307, 481 (1995), Fukushima et al, Biochem 24, 8037 (1985)]

e) Wirkstoff (Protein B) entsprechend der Erfindung ist des weiteren ein zytostatisches, zytotoxisches oder entzündungserregendes Protein, wie beispielsweise:

- Perforin

- Granzym

- Cytokine, wie beispielsweise

- IL-1
- IL-2
- IL-4
- IL-12
- IL-3
- IL-5
- human leukemia inhibitory factor (LIF)
- IL-7
- IL-11
- IL-13
- GM-CSF
- G-CSF
- M-CSF

- Interferone, wie beispielsweise

- IFN α
- IFN β
- IFN γ

- TNF

- TNF α

- TNF β
- Oncostatin M
- Sphingomyelinase [Jarvis et al, PNAS USA 91, 73 (1994)]
- Magainin und Magaininderivate [Cruciani et al, PNAS USA 88, 3792 (1991); Jacob et al, Ciba Found. Symp. 186, 197 (1994); Peck-Miller et al, Cancer Chemother. Pharmac. 32, 109 (1993)] 5
- Chemokine, wie beispielsweise
 - RANTES(MCP-2)
 - monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)
 - IL-8
 - macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 α , - β) neutrophil activating protein-2 (NAP-2) 10
- f) Wirkstoff (Protein B) entsprechend der Erfindung ist des weiteren ein antiangiogenetisches Protein, wie beispielsweise
 - Angiostatin
 - Interferone
 - IFN α 15
 - IFN β
 - IFN γ
 - Platelet factor 4
 - IL-12
 - TIMP-1 20
 - TIMP-2
 - TIMP-3
- g) Wirkstoff (Protein) entsprechend der Erfindung ist des weiteren ein Enzym, welches eine inaktive Vorstufe von einer pharmakologischen Wirksubstanz (z. B. eines Zytostatikums) in die aktive Wirksubstanz überführen kann. 25

Hierzu gehören beispielsweise:

- bakterielle Nitroreduktase
- bakterielle β -Glucuronidase 30
- pflanzliche β -Glucuronidase aus *Secale cereale*
- humane β -Glucuronidase
- humane Carboxy peptidase (CB) zum Beispiel
 - CB-A der Mastzelle
 - CB-B des Pankreas 35
 - bakterielle Carboxy peptidase
- bakterielle β -Laktamase
- bakterielle Cytosine deaminase
- humane Catalase bzw. Peroxidase
- Phosphatase, im besonderen 40
 - humane alkalische Phosphatase
 - humane saure Prostataphosphatase
 - Typ 5 saure Phosphatase
- Oxidase, im besonderen
 - humane Lysyloxidase 45
 - humane saure D-aminooxidase
- Peroxidase, im besonderen
 - humane Gluthation Peroxidase
 - humane Eosinophilen Peroxidase
 - humane Schilddrüsen Peroxidase 50

Wirkstoffe (Protein B) im Sinne der Erfindung ist des weiteren ein Protein, welches das Immunsystem beeinflusst,

- h) beispielsweise ein Protein mit antiallergischer Wirkung, wie 55
 - IFN β
 - IFN γ
 - IL-10
 - lösliche IL-4-Rezeptoren
 - IL-12 60
 - TGF β
- i) oder ein Protein, welches die Abstoßung von transplantierten Organen verhindern kann, wie beispielsweise
 - IL-10
 - TGF β 65
 - lösliche IL-1-Rezeptoren
 - lösliche IL-2-Rezeptoren
 - IL-2-Rezeptorantagonisten

— lösliche IL-6-Rezeptoren

k) oder ein Protein für die Therapie von Antikörper-mediierten Autoimmunerkrankungen, beispielsweise

— TGF β

— IFN α

— IFN β

— IFN γ

— IL-12

— lösliche IL-4-Rezeptoren

— lösliche IL-6-Rezeptoren

l) oder ein Protein für die Therapie von Zell-mediierten Autoimmunerkrankungen, beispielsweise

— IL-6

— IL-9

— IL-10

— IL-13

— TNF α

— IL-4

— TNF β

m) oder ein Protein für die Therapie der Arthritis

Im Sinne der Erfindung werden Strukturgene ausgewählt, deren exprimiertes Protein die Entzündung beispielsweise im Gelenk direkt oder indirekt hemmt und/oder die Rekonstitution von extrazellulärer Matrix (Knorpel, Bindegewebe) im Gelenk fördert.

Hierzu gehören zum Beispiel

— IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-RA);

IL-1-RA inhibiert die Bindung von IL-1 α , - β

— löslicher IL-1-Rezeptor;

löslicher IL-1-Rezeptor bindet und inaktiviert IL-1

— IL-6;

IL-6 erhöht die Sekretion von TIMP und Superoxiden und vermindert die Sekretion von IL-1 und TNF α durch Synovialzellen und Chondrozyten

— löslicher TNF-Rezeptor;

löslicher TNF-Rezeptor bindet und inaktiviert TNF

— IL-4;

IL-4 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1, TNF α und MMP

— IL-10;

IL-10 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1, TNF α und MMP und erhöht die Sekretion von TIMP

— Insulin-like growth factor (IGF-1);

— IGF-1 stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix

— TGF β im speziellen TGF β 1 und TGF β 2

— TGF β stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix Superoxiddismutase

— TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) im speziellen

— TIMP-1

— TIMP-2

— TIMP-3

Wirkstoff (Protein B) im Sinne der Erfindung ist des weiteren ein Protein zur Behebung von Schäden des Nervensystems, beispielsweise

n) ein Wachstumsfaktor, wie

— FGF

— Nerve growth factor (NGF)

— Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

— Neurotrophin-3 (NT-3)

— Neurotrophin-4 (NT-4)

— Ciliary neurotrophic factor (CNTF)

o) oder ein Cytokin oder ein Cytokin-Inhibitor, welcher die neurotoxische Wirkung von TNF α inhibieren oder neutralisieren kann, zum Beispiel für

— TGF β

— lösliche TNF-Rezeptoren

— IL-10;

IL-10 inhibiert die Bildung von IFN γ , TNF α , IL-2 und IL-4

— lösliche IL-1-Rezeptoren

— IL-1-Rezeptor I

— IL-1-Rezeptor II;

lösliche IL-1-Rezeptoren neutralisieren die Aktivität von IL-1

— IL-1-Rezeptor-Antagonist

— lösliche IL-6-Rezeptoren

p) Wirkstoff (Protein B) im Sinne der Erfindung ist des weiteren ein Protein, welches die Angiogenese stimuliert, wie beispielsweise

– VEGF

– FGF

q) Wirkstoff (Protein B) im Sinne der Erfindung ist des weiteren ein Protein, welches den Blutdruck senkt, wie beispielsweise

– Kallikrein

– Endothelzell "nitric oxide synthase"

r) Wirkstoff (Protein B) im Sinne der Erfindung ist des weiteren ein Protein für die Therapie von chronischen Infektionserkrankungen, beispielsweise

– ein Protein, welches zytostatische oder zytotoxische Wirkungen aufweist. (Beispiele für zytotoxische oder zytostatische Proteine wurden bereits aufgeführt) oder

– ein Enzym, welches eine Vorstufe einer antiviralen oder zytotoxischen Substanz in die aktive Substanz spaltet. (Beispiele für derartige Enzyme wurden bereits aufgeführt) oder

– ein antiviral wirksames Cytokin oder ein antiviral wirksamer Wachstumsfaktor. Hierzu zählen beispielsweise

– IFN α

– IFN β

– IFN γ

– TNF β

– TNF α

– IL-1

– TGF β

3.4) Kombination gleicher oder unterschiedlicher Strukturgene

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren ein Genkonstrukt, in welchem eine Kombination der DNA-Sequenzen von zwei gleichen oder zwei unterschiedlichen DNA-Sequenzen für Wirkstoffe (Protein B) [Komponente b) und b')] vorliegt. Zur Expression beider DNA-Sequenzen ist vorzugsweise die cDNA einer "internal ribosome entry site" (IRES) als regulatorisches Element zwischen beiden Strukturen geschaltet.

Eine "internal ribosome entry site" ermöglicht die Expression zweier über eine IRES miteinander verbundener DNA-Sequenzen.

Derartige IRES wurden beispielsweise von Montford und Smith [TIG 11 179 (1995); Kaufman et al, Nucl. Acids Res. 19, 4485 (1991); Morgan et al, Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992); Dirks et al, Gene 128, 247 (1993); Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988) und Sugimoto et al, BioTechn. 12, 694 (1994)] beschrieben.

So kann beispielsweise die cDNA der IRES-Sequenz des Poliovirus (Position ≤ 140 bis ≥ 630 des 5'UTR [Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)] zur Verknüpfung der DNA der Komponente c) mit der DNA der Komponente d) verwendet werden.

3.5) Nukleinsäuresequenzen [Komponente c)] für die durch Proteasen spaltbare Teilstruktur C

Gemäß der Erfindung beinhaltet die Teilstruktur C eine Aminosäuresequenz, welche durch Proteasen gebildet in Tumoren oder von Tumorzellen oder von Entzündungszellen gespalten wird. Die Nukleinsäuresequenz für diese Teilstruktur C ist beispielsweise in die Nukleinsäuresequenz der natürlicherweise vorliegenden Vorstufe (Protein BSD, wobei S die natürlicherweise vorliegende Spaltsequenz darstellt) des jeweiligen Wirkstoffes (Protein B) anstelle der Spaltsequenz S eingefügt, so daß durch diese rekombinierte Nukleinsäure das Protein BCD bzw. B'BCD exprimiert wird.

Je nach der im Tumor oder in der Entzündung vorwiegend sezernierten Protease wird die Nukleinsäuresequenz, die für die Teilstruktur C kodiert, ausgesucht.

Für folgende Enzyme können beispielsweise folgende Teilstrukturen C eingesetzt werden [Barrett et al, Mammalian Proteases, Academic Press, London (1980); Panchal et al, Nature Biotechnol. 14, 852 (1996); Pigott et al, Ayad et al, The extracellular Matrix, Academic Press (1994); Yoshida et al, Int. J. Cancer 63, 863 (1995); Petersen et al, J. Biol. Chem. 265, 6104 (1990); Cramer et al, J. Urology 156, 526 (1995); Forsgen et al, FEBS Lett. 213, 254 (1987) Zhang et al Chin. Chem. 41, 1567, 1995]:

	Enzym	Teilstruktur C					
		Spaltung					
		S4	S3	S2	S1	S-1	(S-2)
5	Plasminogenaktivator	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	(Val)
			Gln	Gly	Arg		
			Gly	Gly	Arg		
10	Prostata-spezifisches Antigen	Pro	Gly	Ly	Arg		
			Arg	Phe	Lys	Ile	(Ile)
			Arg	Pro	Tyr		
15	Cathepsine	Arg	Arg	Phe	Phe	Leu	(His)
		Pro	Arg	Phe	Lys	Ile	(Ile)
					Tyr		
			Lys	Ser	Arg	Met	
20			Lys	Met	Arg	Arg	
			Ile	Arg	Arg	Arg	
			Arg	Ala	Arg	Leu	
25			Gln	Ala	Arg	Phe	
			Lys	Leu	Arg	Leu	
				Lys	Arg	Val	
30					Lys		
				Phe	Arg		
	Stromelysine	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	(Leu)
		Gln	Leu	Gly	Val	Met	(Gln)
35		Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	(Lys)
		Val	Ala	Val	Ser	Ala	(Lys)
		Leu	Ala	Ala	Asn	Leu	(Arg)
40	Collagenase I	Gly	Pro	Gln	Gly	Ile	(Ala)
		Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	(Leu)
	II	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	(Ala)
45	III	Gly	Ile	Ala	Gly	Ile	(Thr)
	VIII	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	(Gly)
		Gly	Phe	Pro	Gly	Ile	(Gly)
50	XI	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	(Ser)
		Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	(Ala)

Die Definitionen der Aminopositionen (S1—S4 und S-1, S-2) erfolgte nach Schechter und Berger, Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 157 (1967).

3.6) Nukleinsäuresequenzen [Komponente d)] kodierend für die Teilstruktur D

Gemäß der Erfindung kodiert die Nukleinsäuresequenz [Komponente d)] für ein Peptid (Teilstruktur D), welches über die Teilstruktur C an den Wirkstoff (Teilstruktur B) bindet und diesen durch diese Bindung inaktiviert.

Bevorzugt werden für die Teilstruktur D solche Nukleinsäuresequenzen genommen, welche in den naturgemäßen Vorstufen (Protein BSD) für die Teilstruktur D kodieren, wobei im Protein BSD die Teilstruktur S die natürliche Spaltsequenz darstellt.

Die Strukturen der naturgemäßen Vorstufen von Wirkstoffen (Protein B) wurden bereits übersichtlich dargestellt, so beispielsweise für Gerinnungsfaktoren, Komplementfaktoren und Kallikrein [Bartett et al., Mammalian Proteases, Academic Press, London (1980)]

für Interleukine, Chemokine und Wachstumsfaktoren [Callard et al, The Cytokine Facts Book, Academic Press (1994)]

für Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) [Denhardt et al, Pharmac. Ther. 59, 329 (1993)]

Bei Auswahl von Wirkstoffen, welche keine natürlicherweise vorkommenden Vorstufen besitzen und bei xenogenen Wirkstoffen sind als Komponente d) Nukleinsäuresequenzen kodierend für beliebige Peptide zu verwenden, bevorzugt jedoch für solche Teilstrukturen D, welche in den Vorstufen menschlicher Wirkstoffe natürlicherweise vorkommen.

3.7) Einfügung von Signalsequenzen

Zur Erleichterung der Sekretion des von der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz exprimierten Proteins BCD bzw. B'BCD kann die ggf. in der DNA-Sequenz der Komponente b) enthaltende homologe Signalsequenz ersetzt werden durch eine heterologe, die extrazelluläre Ausschleusung verbessernde Signalsequenz.

So kann beispielsweise die Signalsequenz für das Immunglobulin [DNA Position ≤ 63 bis ≥ 107 Riechmann et al, Nature 332, 323 (1988)] oder die Signalsequenz für das CEA [DNA Position ≤ 33 bis ≥ 134 Schrewe et al, Mol. Cell Biol. 10, 2738 (1990); Berling et al, Cancer Res. 50, 5634 (1990)] oder die Signalsequenz des humanen Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins [cDNA der Aminosäuren ≤ 38 bis ≥ 50 oder 48 bis 65; Lichtenstein et al, J. Gen. Virol. 77, 109 (1996)] eingefügt werden.

Des weiteren kann zur Verstärkung der Translation am 3' Ende der Promotorsequenz und unmittelbar am 5' Ende des Startsignals (ATG) der Signalsequenz die Nukleotidsequenz GCCACC oder GCCGCC eingefügt [Kozak, J. Cell Biol. 108, 299 (1989)] werden.

3.8) Anwendung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes

Das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt dient zur Verwendung zur Herstellung von Heilmitteln zur Behandlung von Erkrankungen, welche mit einer erhöhten lokalen Bildung von Proteasen einhergehen, so beispielsweise von Tumorerkrankungen, Leukämien, Allergien, Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Entzündungen, Abstoßungsreaktionen von Transplantaten, Thrombosen und Gefäßverschlüssen und anderen Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufes, Verletzungen von Geweben, einschließlich von Verletzungen des zentralen Nervensystems oder Schäden des Nervensystems. Die Verabreichung erfolgt lokal (z. B. auf die Haut, nasal, oral, gastrointestinal, intrabronchial, intravesikal, intravaginal, intrauterin, subkutan, intramuskulär, periartikulär, intraartikulär, in den Liquor, in das Hirngewebe, in das Rückengewebe, in Wunden intraperitoneal, intraperitoneal, intrapleural) oder systemisch (intravenös, intraarteriell, intraportal, intracardial).

Die Erfindung bezieht sich daher auch auf die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes zur Herstellung eines Heilmittels zur lokalen (z. B. auf die Haut, nasal, oral, gastrointestinal, intrabronchial, intravesikal, intravaginal, intrauterin, subkutan, intramuskulär, periartikulär, intraartikulär, in den Liquor, in das Hirngewebe, in das Rückenmarksgewebe, in Wunden intraperitoneal oder intrapleural) oder systemischen (z. B. intravenös, intraarteriell, intraportal oder intracardial) Verabreichung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumoren, Leukämien, Autoimmunerkrankungen, Entzündungen, Schäden des Nervensystems, Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufes und von Infektionserkrankungen.

Je nach Art und Ort der Erkrankung und der zu transduzierenden Zielzelle wird aus den bereits aufgeführten Beispielen für Promotorsequenzen und Strukturgenen (für das Protein BCD bzw. B'BCD) folgende Auswahl getroffen:

a) Therapie von Tumoren

Promotoren [Komponente a)]:

- endothelzellspezifisch und Zellzyklus-spezifisch oder
- zellunspezifisch oder Muskelzell-spezifisch und Zellzyklus-spezifisch

oder

- Tumorzell-spezifisch (solide Tumoren, Leukämien)

Liganden für folgende Zielzellen [Komponente b')]:

- proliferierende Endothelzellen oder
- der Endothelzelle benachbarte Stromazellen und Muskelzellen oder
- Tumorzellen oder Leukämiezellen

Strukturgene [Komponente b)c)d)]:

- für Gerinnung induzierende Faktoren für Komplementfaktoren
- für Angiogeneseinhibitoren
- für zytostatische und zytotoxische Proteine
- für Induktoren von Entzündungen oder
- für Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika, zum Beispiel für Enzyme, welche inaktive

Vorsubstanzen (Prodrugs) in aktive Zytostatika (Drugs) spalten

b) Therapie von Autoimmunerkrankungen und Entzündungen

5 Promotoren [Komponente a)]:

- Endothelzell-spezifisch und Zellzyklus-spezifisch oder
- Makrophagen- und/oder Lymphozyten-spezifisch und/oder Zellzyklus-spezifisch oder
- Synovialzell-spezifisch und/oder Zellzyklus-spezifisch

10

Liganden für folgende Zielzellen [Komponente b')]:

- proliferierende Endothelzellen oder
- Makrophagen und/oder Lymphozyten oder
- Synovialzellen

15

Strukturgene [Komponente b)c)d)]:

- für die Therapie von Antikörper-mediierten Autoimmunerkrankungen
- für Inhibitoren der Zellproliferation, zytostatische oder zytotoxische Proteine oder
- Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika oder
- für die Therapie von Arthritis

20

c) Therapie von Schäden des Nervensystems

25

Promotoren [Komponente a)]:

- Gliazell-spezifisch oder
- Endothelzell-spezifisch und Zellzyklus-spezifisch oder
- unspezifisch und Zellzyklus-spezifisch

30

Liganden für folgende Zielzellen [Komponente b')]:

- Gliazellen oder
- proliferierende Endothelzellen

35

Strukturgene [Komponente b)c)d)]:

- für neuronale Wachstumsfaktoren, zum Beispiel
- für Cytokine und Cytokin-Inhibitoren, welche die neurotoxische Wirkung von TNF α inhibieren oder neutralisieren.

40

d) Therapie von Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufsystems

45 Promotoren [Komponente a)]:

- zellunspezifisch oder
- zellunspezifisch und Zellzyklus-spezifisch oder
- spezifisch für Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Makrophagen oder
- spezifisch für Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Makrophagen und Zellzyklus-spezifisch

50

Liganden für folgende Zielzellen [Komponente b')]:

- Endothelzellen
- proliferierende Endothelzellen
- somatische Zellen in Nachbarschaft von Endothelzellen und glatte Muskelzellen oder Makrophagen

55

Strukturgene [Komponente b)c)d)]:

- für die Inhibition der Gerinnung oder für die Förderung der Fibrinolyse.
- für Angiogenesefaktoren
- für Blutdruck senkende Peptide
- für ein antiproliferatives, zytostatisches oder zytotoxisches Protein oder
- für ein Enzym zur Aufspaltung von Vorstufen von Zytostatika in Zytostatika zur Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen nach Verletzungen der Endothelschicht oder
- für Blutplasma-proteine
 - C1-Inaktivator
 - Serum Cholinesterase

60

65

— α 1-Antritypsin

e) die Therapie von chronischen Infektionserkrankungen

Promotoren [Komponente a)]:

- virusspezifisch
- zellspezifisch oder
- virusspezifisch oder zellspezifisch und zellzyklusspezifisch

Liganden für folgende Zielzelle [Komponente b')]:

- Leberzelle
- Lymphozyt und/oder Makrophage
- Epithelzelle oder
- Endothelzelle

Strukturgene [Komponenten b)c)d)], beispielsweise für

- ein Protein, welches zytostatische oder zytotoxische Wirkungen aufweist.
- ein Enzym, welches eine Vorstufe einer antiviralen oder zytotoxischen Substanz in die aktive Substanz spaltet.
- für antivirale Proteine, wie beispielsweise antiviral wirksame Cytokine und Wachstumsfaktoren

3.9 Herstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte

Die hier beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte werden hergestellt, indem die einzelnen Komponenten gemäß molekularbiologischen Standardverfahren miteinander verknüpft werden. Die Erfindung wird an folgenden Beispielen näher erläutert:

4) Beispiele zur Erläuterung der Erfindung

Herstellung eines Genkonstruktes für einen durch das Prostata-spezifische Antigen.

4.1) aktivierbaren Wirkstoff

Es wird ein Therapeutikum für die Behandlung von Metastasen des Prostatakarzinoms hergestellt. Trotz chirurgischer Entfernung einer zum Karzinom erkrankten Prostata treten häufig Metastasen des Prostatakarzinoms auf, die derzeit noch weitgehend unheilbar sind und zum Tod des Patienten führen. Derartige Prostatakarzinommetastasen induzieren Angiogenese. Des weiteren sezernieren Prostatakarzinommetastasen ein gewebe-spezifisches Enzym, das Prostata-spezifische Antigen (PSA). Entsprechend der Erfindung wird ein Genkonstrukt hergestellt, welches eingeführt in proliferierende Endothelzellen zur Expression eines modifizierten Gerinnungsfaktors FX führt. Die Modifikation besteht darin, daß im Gen für den natürlichen FX die Nukleotidsequenz für die natürliche Spaltstelle (deren Spaltung zum gerinnungsaktiven FXa führt) ausgetauscht ist gegen eine Nukleotidsequenz für eine PSA-spezifische Spaltstelle. Hierdurch ist das von Prostatakarzinommetastasen sekretierte PSA in der Lage, das von proliferierenden Endothelzellen in der Nachbarschaft der Metastasen sekretierte modifizierte FX spezifisch zu aktivieren und hierdurch die Gerinnung einzuleiten, welche zur Unterbrechung der Blutzufuhr der Metastase und damit zu deren Nekrose führt.

a) Das Genkonstrukt für den durch PSA aktivierbaren FX wird nach einem Schema hergestellt, welches in Fig. 3 dargestellt ist.

Die DNA-Sequenzen der Einzelkomponenten werden in Richtung 5' zu 3' wie folgt zusammengefügt:

a.1) Komponente a):

- die Promotorsequenz des cdc25C Genes [Nukleinsäuren: -290 bis +121; Lucibello et al, EMBO J. 14 132 (1995); Zwicker et al, Nucl. Acids Res. 23, 3822 (1995); EMBO J. 14, 4514 (1995)]
- die Sequenz GCCACC (Kozak, J. Cell Biol. 108, 229 (1989))
- die cDNA für das Signalpeptid des Immunglobulins [Nukleotidsequenz ≤ 63 bis ≥ 107 ; Riechmann et al, Nature 332, 323 (1988)]

a.2) Komponente b)c)d):

- die cDNA des humanen FX (Nukleotidsequenz 1 bis ≥ 1468) [Messier et al, Gene 99, 291 (1991)] mit Mutation in Aminosäure 194 von Arg nach Tyr.

Die Verknüpfung der einzelnen Bestandteile des Konstruktes erfolgt über geeignete Restriktionsstellen, die über PCR-Amplifikation an den Termini der verschiedenen Elemente mitgeführt werden. Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von den dem Fachmann bekannten, für die Restriktionsstellen spezifischen Enzymen und DNA-Ligasen. Diese Enzyme sind käuflich zu erwerben.

Das so hergestellte Nukleotidkonstrukt wird in puc 18119 oder Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren inkloniert.

b) Expression in humanen embryonalen Nierenzellen.

Mit dem beschriebenen Plasmid werden in Kultur gehaltene proliferierende menschliche embryonale Nierenzellen [HEK 293; Racchi et al., J. Biol. Chem. 268, 5735 (1993)] mit der dem Fachmann bekannten Methode [Graham und van der Eb, Virology 52, 456 (1973)] transfiziert.

Aus dem Überstand von ca. 10^7 transfizierten HEK 293-Zellen wird der mutierte Faktor X angereinigt [Watzke et al., J. Clin. Invest. 88, 1685 (1991)] und in einem Gerinnungstest für Faktor X mit und ohne Zusatz von PSA geprüft. Gereinigtes PSA wird von Chemicon (Temecula, CA, USA) bezogen.

In diesem Test wird der Koagulationsdefekt von menschlichem F X Mangelplasma durch funktionell aktives FXa kompensiert.

Als Positivkontrolle wird nicht mutierter (Wildtyp) FX (aktiviert durch Russel's viper venom) eingesetzt. Neben dem Testansatz ohne PSA dient als Negativkontrolle eine Mockpräparation aus dem Überstand nichttransfizierter HEK 293-Zellen.

Die Gerinnungsaktivität des mutierten FX wird mittels Rekalzifizierungszeit (Seitz R et al., Int. J. Cancer 53: 514—520, 1993) gemessen. 100 µl FX-Mangelplasma (Behring) werden mit 100 µl der FX-Präparation aus dem Zellüberstand für 120 sec bei 37° inkubiert. Die FX-Präparation enthält PSA als Aktivator. Für die Negativkontrolle wird kein PSA zugefügt. Als Positivkontrolle wird FX (Wildtyp) und Russel Viper Venon (RVV) eingesetzt. Die Gerinnungsreaktion wird durch Zugabe von 100 µl 0.02 M CaCl_2 gestärkt und in einem Koagulometer bestimmt.

Folgende Ergebnisse werden erzielt:

Die Negativkontrollen ohne Aktivierung der Gerinnung ergaben eine Gerinnungszeit von ca. 200 sec. Im Gegensatz hierzu lassen sich mit aktiviertem FX (mutiertes FX und PSA bzw. Wildtyp FX und RVV) signifikant verkürzte Gerinnungszeiten von 50 sec erreichen.

Es läßt sich somit schlußfolgern, daß die transduzierten HEK 293-Zellen mutierten FX exprimieren, welcher unter Zusatz von PSA den Koagulationsdefekt von FX Mangelplasma kompensiert.

b) Expression in humanen Endothelzellen

Mit dem beschriebenen Plasmid werden in Kultur gehaltene menschliche Nabelschnurendothelzellen mit der dem Fachmann bekannten Methode (Lucibello et al., EMBO J 14 132 (1995)) transfiziert.

Zur Überprüfung der Zellzykluspezifität werden Endothelzellen durch Entzug von Methionin über 48 Stunden in G0/G1 synchronisiert (Nettelbeck et al., Publikation in Vorbereitung). Der DNA-Gehalt der Zellen wird nach Anfärbung mit Hoechst 33258 im Fluoreszenzaktivierungs-Cell Sorter bestimmt (Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995)).

Die Expression des Genkonstruktes wird im Überstand der Endothelzellen analog der Untersuchung an HEK 293-Zellen überprüft.

Folgende Ergebnisse werden erzielt:

Das exprimierte Protein transfizierter Endothelzellen führt zur Kompensation des Koagulationsdefektes von FX Mangelplasma im Gegensatz zu Mockpräparationen aus dem Überstand nichttransfizierter Endothelzellen.

Im Überstand von proliferierenden, transduzierten Endothelzellen (DNA > 2S) ist eine deutlich höhere Konzentration mutierten FX nachzuweisen als im Überstand von in G0/G1 synchronisierten Endothelzellen (DNA = 2S).

Somit führt das beschriebene Genkonstrukt zu einer zellzyklusabhängigen Expression des Genes für den mutierten FX in Endothelzellen und dieses mutierte FX kann durch PSA aktiviert werden, so daß es im FX Mangelplasma eine Gerinnung bewirkt.

Figurenlegende

Fig. 1 Schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukts

Fig. 2 Schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukts erweitert um die Komponente b'

Fig. 3 Schematische Darstellung eines Genkonstrukts für den durch PSA aktivierbaren Faktor X.

Patentansprüche

1. Genkonstrukt dadurch charakterisiert, daß es ein Protein exprimiert, welches durch Enzyme, freigesetzt von Zellen, aktiviert wird, bei welchem das Genkonstrukt besteht aus den Komponenten

a) mindestens einem Promotorelement

b) mindestens einer DNA-Sequenz für einen Wirkstoff (Protein B)

c) mindestens einer DNA-Sequenz für eine durch ein Enzym, freigesetzt von einer Säugerzelle, spezifisch spaltbare Aminosäuresequenz (Teilstruktur C)

d) mindestens einer DNA-Sequenz für ein Peptid oder Protein (Teilstruktur D), welches durch Bindung über die spaltbare Aminosäuresequenz (Teilstruktur C) an den Wirkstoff (Protein B) die Wirksamkeit des Wirkstoffes (Protein B) hemmt.

2. Genkonstrukt nach Anspruch 1, bei welchem die Enzyme Proteasen sind.

3. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 oder 2, bei welchem die Zellen Tumorzellen, Leukämiezellen, Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten, Muskelzellen, Epithelzellen, Gliazellen, Synovialzellen oder virusinfizierte Zellen sind.
4. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welchem das Genkonstrukt ergänzt ist um die Komponente b'), die mindestens eine DNA-Sequenz für einen Liganden (Teilstruktur B') darstellt, welcher den Wirkstoff (Protein B) an eine Zielstruktur bindet. 5
5. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei welchem die Teilstruktur C durch Plasminogenaktivatoren, Cathepsine oder Matrix-Metalloproteinasen spaltbar ist.
6. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei welchem die Teilstrukturen B und D Teile der natürlichen Vorstufen von Proteinwirkstoffen sind, wobei die natürliche Spaltsequenz, welche die Teilstrukturen B und D verbindet, durch die Teilstruktur C ersetzt worden ist. 10
7. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei welchem die Teilstruktur D die Teilstruktur der natürlichen Vorstufe eines Proteinwirkstoffes ist.
8. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei welchem die Teilstruktur B (Wirkstoff Protein B)
 - das Gerinnungssystem aktiviert 15
 - das Gerinnungssystem inhibiert
 - die Fibrinolyse aktiviert
 - das Komplementsystem aktiviert
 - das Kininsystem aktiviert
 - ein Enzym ist, welches die inaktive Vorstufe einer pharmakologischen Substanz überführt in die aktive Substanz oder 20
 - selbst eine pharmakologisch aktive Substanz darstellt.
9. Genkonstrukt nach Anspruch 8, bei welchem die Teilstruktur B (Wirkstoff Protein B) darstellt
 - einen Gerinnungsfaktor, ausgewählt aus Thrombin, Faktor Va, Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor Xa, TF gerinnungsaktive Fragmente oder Faktor XIIa 25
 - Thrombin, mutiert im Bereich der Spaltstelle Arg-Thr (Aminosäureposition 327/328)
 - ein fibrinolytisches Protein, ausgewählt aus Urokinase, tPA oder Hybriden hiervon
 - einen Komplementfaktor, ausgewählt aus C5b, C3b oder Spaltprodukten hiervon
 - ein antithrombotisches Protein, ausgewählt aus Protein C, C-1S-Inhibitor, α 1-Antitrypsin, Hirudin, AT-III, TFPI, PAI-1, PAI-2 oder PAI-3 30
 - ein Kallikrein
 - ein zytostatisches, zytotoxisches oder entzündungserregendes Protein
 - ein antiangiogenetisches Protein
 - ein immunmodulierendes Protein
 - ein antientzündlich wirkendes Protein 35
- ein Schädern des Nervensystems behebendes Protein
 - ein die neurotoxische Wirkung von TNF α inhibierendes oder neutralisierendes Protein
 - ein die Angiogenese stimulierendes Protein
 - ein den Blutdruck senkendes Protein oder
 - ein antivirales Protein. 40
 - ein Cytokin, ein Interferon, einen Tumornekrosefaktor, Oncostatin M oder LIF
 - einen Cytokinrezeptor, den zellexternen Teil eines Cytokinrezeptors oder einen Cytokinantagonisten
 - einen Wachstumsfaktor, einen Wachstumsfaktorrezeptor oder den zellexternen Teil eines Wachstumsfaktorrezeptors 45
 - ein Chemokin
 - Angiostatin, Platelet factor 4
 - TIMP-1, -2 oder -3
 - eine Nitroreduktase, eine β -Glucuronidase, eine Carboxypeptidase, eine β -Laktamase, eine Cytosindeaminase, eine Catalase, eine Peroxidase, eine Phosphatase oder eine Oxidase oder 50
 - Kallikrein oder eine Endothelzellnitritoxidsynthase.
10. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 9, welches mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche Komponenten b)c)d) bzw. b')b)c)d) enthält, welche über eine internal ribosomal entry site (IRES) miteinander verbunden sind.
11. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei welchem die Komponente a) eine uneingeschränkt aktivierbare, eine virale, eine metabolisch aktivierbare, eine zellzyklusspezifisch aktivierbare, eine durch Tetrazyklin aktivierbare oder eine zellspezifisch aktivierbare Promotorsequenz darstellt. 55
12. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 11, bei welchem die Komponente a) eine Kombination von mindestens zwei gleichen oder unterschiedlichen Promotorsequenzen darstellt.
13. Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 10 oder 11, bei welchem die Komponente a) bevorzugt in Endothelzellen, in Zellen in Nachbarschaft aktivierter Endothelzellen, in Muskelzellen, in Leukämiezellen, in Tumorzellen, in Gliazellen, in Lymphozyten, in Makrophagen oder in Synovialzellen aktiviert wird. 60
14. Genkonstrukt nach Anspruch 4, bei welchem die Komponente b') für einen Liganden (Teilstruktur B') kodiert, welcher an einen Zellmembranrezeptor, an ein Zellmembranantigen oder an ein zellmembranständiges Adhäsionsmolekül oder an die extrazelluläre Matrix bindet. 65
15. Genkonstrukt nach Anspruch 4, bei welchem der Ligand darstellt
 - einen Wachstumsfaktor, ein Cytokin, ein Interferon, einen Tumornekrosefaktor oder ein Chemokin
 - oder die Rezeptor-bindende Teilsequenz dieser Liganden

- ein Peptidhormon
- Angiotensin, Kinin oder Folsäure
- ein Adhäsionsmolekül oder die an das korrespondierende Adhäsionsmolekül oder an die extrazelluläre Matrix bindende Teilsequenz des Adhäsionsmoleküls
- der extrazelluläre Teil eines Fc-Rezeptors
- ein Antikörpermolekül, der Epitop-bindende Teil eines Antikörpermoleküls, ein single chain Fv-Fragment oder ein rekombinantes Fv-Fragment spezifisch für ein Zellmembranantigen oder für ein Antigen auf der extrazellulären Matrix oder
- ein Glykoprotein eines Virus mit einem Tropismus für ausgewählte Zellen oder einer an diese Zellen bindende Teilsequenz des Glykoproteins.

16. Genkonstrukt nach Anspruch 14, bei welchem der Ligand bevorzugt bindet an Endothelzellen, an aktivierte Endothelzellen, an proliferierende Endothelzellen, an Muskelzellen, an proliferierende Endothelzellen, an Muskelzellen, an Makrophagen, an Lymphozyten, an Synovialzellen, an Entzündungszellen, an mit Viren infizierte Zellen, an Leberzellen, an Bronchialepithelzellen, an Gliazellen, an Leukämiezellen oder an Tumorzellen.

17. Genkonstrukt nach Anspruch 4, bei welchem die Komponente b' für einen Liganden (Teilstruktur B') kodiert, welcher die Transmembrandomäne eines Rezeptors oder eines viralen Glykoproteins darstellt oder ein Glykophospholipidanker ist.

18. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 17, eingefügt in ein Plasmid oder einen viralen Vektor.

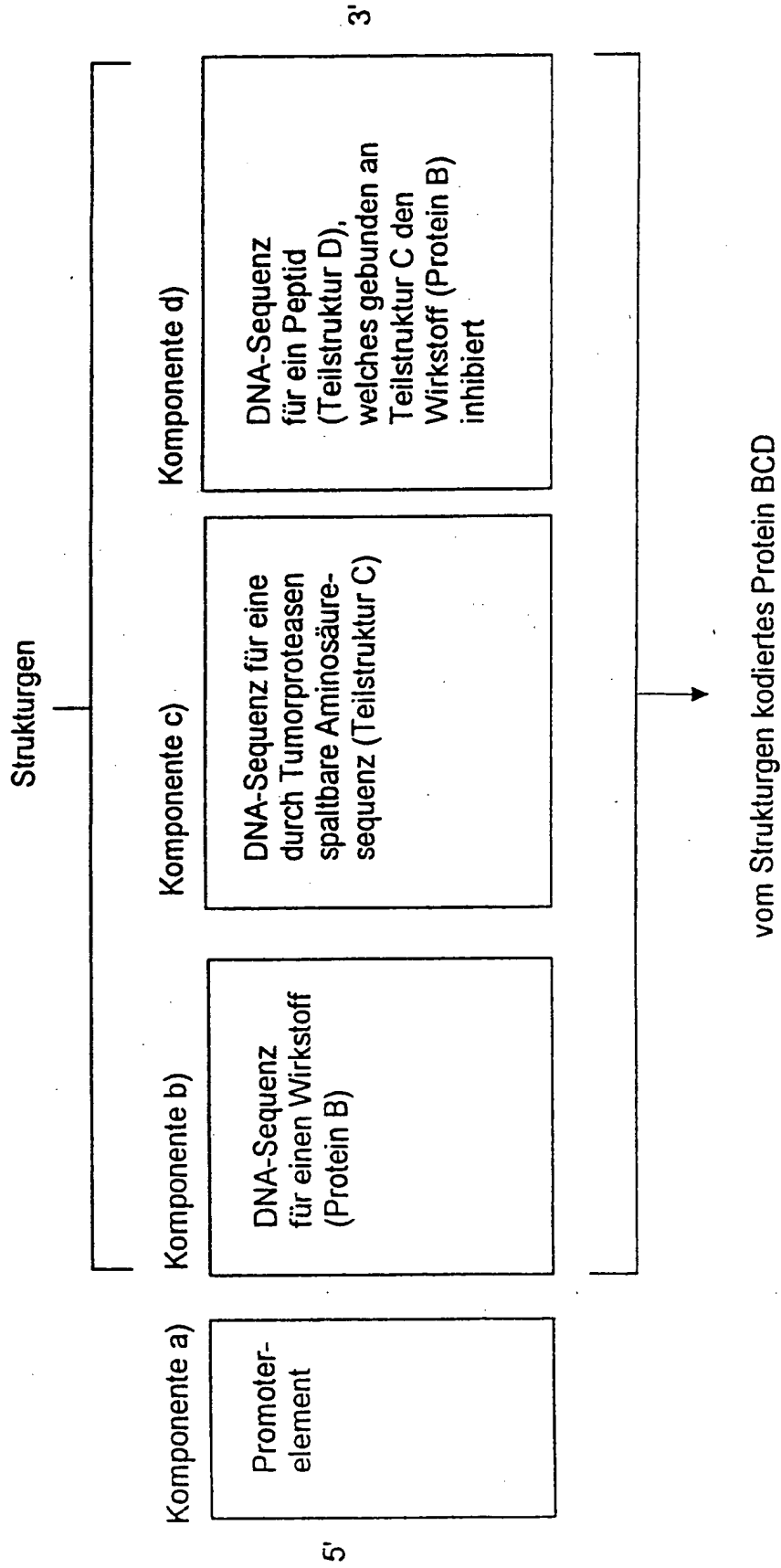
19. Verwendung eines Nukleinsäurekonstrukts nach Anspruch 1 bis 18 zur Herstellung eines Heilmittels zur lokalen oder systemischen Verabreichung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Tumoren, Leukämien, Autoimmunerkrankungen, Entzündungen, Schäden des Nervensystems, Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufes und von Infektionserkrankungen.

20. Verfahren zur Herstellung eines Genkonstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 18 bei dem die das Genkonstrukt enthaltenden Komponenten durch molekularbiologische Standardmethoden miteinander verknüpft werden.

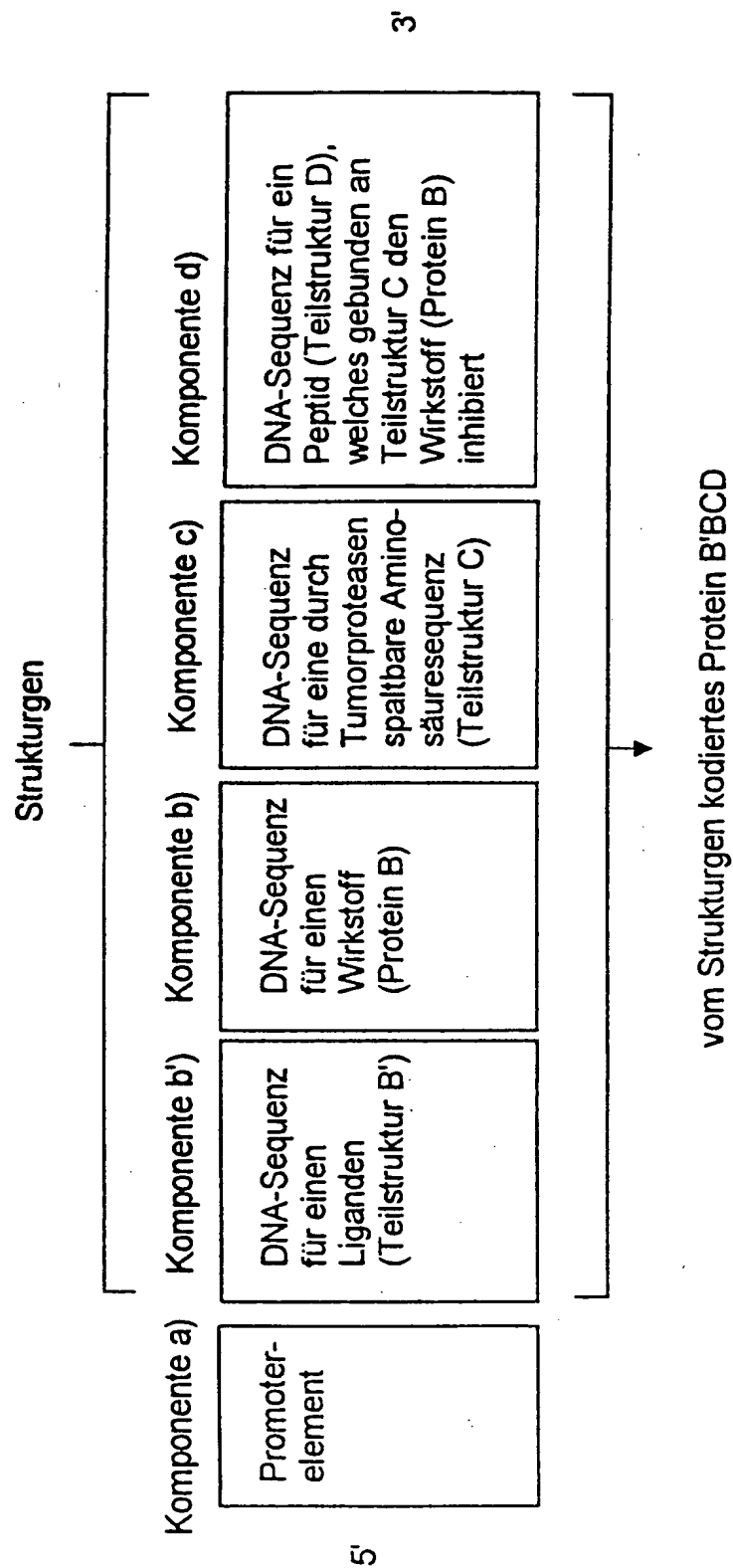
Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Figur 1



Figur 2



Figur 3

